نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۳۷۶-۳۶۸

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 3, Fall 2013, P. 368-376

مهار زیستی نماتد مرکبات *Tylenchulus semipenetrans* به وسیله قارچ‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه

معصومه چاووشی ثانی[۱] - سالار جمالی[۲*] - حسین طاهری[۳] - سید اکبر خداپرست[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۹/۱۸
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۴/۲۴

چکیده

به منظور بررسی مهار زیستی نماتد مرکبات (*Tylenchulus semipenetrans*)، نمونه‌برداری از خاک و ریشه در باغ‌های مرکبات شرق گیلان و غرب مازندران انجام شد. لارو سن دوم نماتد مرکبات از خاک و ماده و تخم از ریشه‌ها جداسازی گردیدند. جهت جداسازی قارچهای آنتاگونیست، سوسپانسیون تخم و لارو نماتد به طور جداگانه روی محیط کشت آب آگار حاوی استرپتومایسین کشت شدند. قارچ‌های شناسایی شده عبارتند از: *Cladosporium cladosporioides, Paecilomyces lilacinus , F. oxysporum, Fusarium solani* و *Acremonium strictum*. جهت تعیین فعالیت آنتاگونیستی قارچها، تیمارهای قارچی در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. خاصیت نماتدکشی قارچها با نماتدکش سیستمیک از گروه ارگانوفسفات‌ها به نام فنامیفوس (نماکور) مورد مقایسه قرار گرفت. دو شاخص شامل تعداد نماتد ماده در یک گرم ریشه و جمعیت لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک محاسبه گردید. نتایج نشان داد همه قارچهای مورد آزمون دارای اثرات بازدارندگی روی *Tylenchulus semipenetrans* بودند. با توجه به مقایسه‌ی میانگین تیمارها، قارچهای *P. lilacinus* و *A. strictum* بیشترین تأثیر را بر کاهش تعداد نماتد ماده دارا بودند. *C. cladosporioides* پس از شاهد در بالاترین گروه آماری نسبت به سایر تیمارها قرار داشت و ضعیف‌ترین عامل در کنترل عمل نمود. همچنین مقایسه زمان تلقیح نماتد نشان داد که تیمارهای تلقیح شده با نماتد ۲۰ روز پس از از تلقیح قارچ، عملکرد بهتری داشتند. در بین گونه‌های قارچی با خاصیت ضدنماتدی، *P. lilacinus* و *A. strictum* مؤثرتر از سایر گونه‌ها عمل کردند. با اینحال دو گونه‌ی *F. solani* و *F. oxysporum* مورد استفاده در این تحقیق نیز در برابر نماتد مرکبات کارایی خوبی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: زوال تدریجی، مدیریت تلقیقی، نماتد مرکبات، قارچهای پارازیت کننده

مقدمه

از میان تعداد ۲۳ گونه از نماتدهای انگل درختان مرکبات در جهان، نماتد مرکبات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb,1913 یکی از مهم‌ترین آنها از نظر میزان خسارت و انتشار می‌باشد که باعث کاهش محصول و زوال تدریجی[۵] مرکبات می‌گردد. این نماتد برای اولین بار توسط هوجز[۶] در سال ۱۹۱۲ روی ریشه پرتقال در کالیفرنیا مشاهده و گزارش شد. سپس کوب[۷] در سال ۱۹۱۴ سیکل زندگی، شکل نماتد و نحوه گسترش آن را مورد مطالعه قرار داد (۱۹). در ایران اولین بار این نماتد توسط ایزدپناه و سفریان (۲) در سال ۱۳۴۷ از ملاثانی اهواز روی مرکبات گزارش گردید و در همان سال نیز به وسیله امیدوار از شیراز گزارش شد. اغلب مطالعات میزان کاهش محصول به دلیل نماتد مرکبات را حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد تخمین می‌زنند که این مقدار به عوامل مختلفی از جمله حساسیت ریشه‌ها ، شرایط آب و هوایی، خصوصیات خاک و حضور سایر پاتوژن‌ها وابسته است (۱۸). بررسی های انجام شده در شهرستان جهرم بیانگر گسترش وسیع این نماتد در باغهای مرکبات بوده به گونه ای که حدود ۸۵ درصد از درختان مورد بررسی آلوده به نماتد مرکبات بوده اند (۸). باغهای مرکبات شمال کشور نیز ۸۹ درصد نسبت به این نماتد آلودگی دارند (۴۵).

کوب (۱۳) اولین کسی بود که انگل‌ها و شکارگرها را به عنوان عوامل کنترل زیستی نماتدها به کار برد. با توجه به افزایش خطرات

۱، ۲ و ۴ - به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: (Email: Jamali@guilan.ac.ir)
۳- مربی مرکز تحقیقات مرکبات رامسر

5- Slow decline
6- Hodges
7- Cobb

زیست محیطی نماتدکش‌ها و اثرات سوء روی سلامتی انسان و همچنین مشکل بودن مدیریت نماتدها، تلاش محققان در جهت دستیابی به راهکارهای مناسب کنترل افزایش یافته است . در دهه-های اخیر استفاده از آنتاگونیست‌ها یا کنترل بیولوژیک مطرح شده است. این روش فاقد آلودگی زیست‌محیطی بوده و استفاده از آن به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی نماتدها بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است.

قارچ *Paecilomyces lilacinus* از فراوان‌ترین گونه‌های قارچ است که از تخم‌ها، ماده‌ها و لاروهای سن دوم نماتد مرکبات در اسپانیا جدا شده است (۲۱). قارچ‌های *P. lilacinus, Dactylella ellipsospora, Arthrobotrys oligospora, Verticillium chlamydosporium. P. marquandii* از توده تخم‌های نماتد مرکبات در فلوریدا جدا شده‌اند (۴۹). پاشا و همکارانش (۳۹) ۱۷ گونه قارچ از خاک و ریشه‌های درختان لیمو آلوده به *T. semipenetrans* جدا کردند. گاسپارد و مانکائو (۲۰) قارچ‌های نماتدخوار را از ۴۳ باغ مرکبات جداسازی کردند و دریافتند که جمعیت این قارچ‌ها در باغات آلوده به *T. semipenetrans* بیشتر از باغات بدون آلودگی است. مواد آلی کلونیزه شده توسط قارچ *Paecilomyces lilacinus* جمعیت نماتد مرکبات *T. semipenetrans* را در باغات مرکبات کاهش داده است (۲۶). همچنین تاثیر قارچ *P. lilacinus* در کنترل نماتد مولد غده *M. javanica* مورد مطالعه قرار گرفت. *P. lilacinus* تخم‌های *M. javanica* را به میزان ۷۶/۲۵ درصد پارازیت کرد (۱۴). ردی و همکاران (۴۰) معتقدند ترکیبی از گونه *T. harzianum* جدایه T-12 و بقایای زیتون جمعیت نماتد مرکبات را کاهش می دهد. مورگان و همکارانش (۳۵) قارچ‌های *F. solani, F. oxysporum* و *Stagonospora heteroderae* را از سیست‌های نماتد *Heterodera glycines* جداسازی کردند. نای و همکاران (۳۷) گونه‌های *Acremonium strictum* و *F. oxysporum* را از تخم‌های نماتد سیستی چغندر قند در کالیفرنیا جدا کردند. در ایران فاطمی (۵) قارچ *Paecilomyces fumosoroseus* را از سیست‌های *H. schachtii* از مشهد جدا نمود. احمدی و همکاران (۱) چهار جدایه *Fusarium solani* را از نماتود سیستی چغندرقند در اصفهان جدا کردند. مهدی‌خانی مقدم و همکاران (۷) به منظور کنترل بیولوژیک نماتود سیستی چغندر قند *(Heterodera schachtii)* اثر ۱۰ جدایه از قارچ تریکودرما متعلق به گونه های *T. virens* و*Trichoderma harzianum* را در شرایط آزمایشگاه و گلخانه روی تخم و سیست این نماتود مورد بررسی قراردادند .نتایج نشان داد که جدایه های قارچ تریکودرما در شرایط آزمایشگاه به طور متوسط، سبب از بین رفتن ۶۰ درصد تخم ها نسبت به شاهد شدند. آلودگی به نماتد مرکبات در خاک و ریشه باغهای مرکبات منطقه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و هدف از انجام این تحقیق جداسازی قارچ های آنتاگونیست از خاک باغهای مرکبات و بررسی قابلیت آنتاگونیستی آن ها در برابر نماتد مرکبات می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از باغهای مرکبات شرق گیلان و غرب مازندران (از لنگرود درگیلان تا چالوس در مازندران) انجام شد. از هر باغ پنج درخت انتخاب و از هر درخت سه نمونه جمع‌آوری شد. عمق نمونه-برداری از ۵ تا ۳۰ سانتی‌متری عمق خاک در نظر گرفته شد. نمونه‌های هر درخت کاملا مخلوط و یک نمونه نماینده به مقدار حدود ۵۰۰ گرم تهیه شد. نمونه‌های خاک و ریشه جمع‌آوری شده به آزمایشگاه نماتدشناسی منتقل و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. برای استخراج لارو موجود در خاک از روش الک و سانتریفوژ (۲۷) و روش سینی Tray و جهت استخراج نماتد ماده و تخم از ریشه‌ها از روش مخلوط‌کن و سانتریفوژ استفاده شد. در این روش، ابتدا مقدار یک گرم از ریشه‌های آلوده به آرامی با آب شسته و با مخلوط‌کن به قطعات ۱ تا ۲ سانتی‌متری تقسیم شد. قطعات به ظرفی درب‌دار محتوی ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد منتقل شد. ظرف مدت ۴-۳ دقیقه به شدت تکان داده شد تا ماتریکس ژلاتینی نماتد ماده حل شده و تخم‌ها از توده تخم رها شوند. سپس سوسپانسیون از الک ۱۰۰ مش (۱۵۰ میکرومتر) و ۵۰۰ مش (۲۵ میکرون) عبور داده شد. الک ۱۰۰ مش به منظور جمع‌آوری ضایعات و قطعات ریشه استفاده می‌شود. محتویات سطح الک ۵۰۰ مش به کمک آب مقطر استریل شسته و به یک بشر انتقال داده شدند. سوسپانسیون حاصل درون لوله‌های سانتریفیوژ ریخته و پودر کائولین (هشت گرم در هر لیتر سوسپانسیون) به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. برای محلول شکر نیز از همین سرعت برای مدت چهار دقیقه استفاده گردید. محتویات لوله‌های سانتریفوژ روی الک ۵۰۰ مش جمع آوری و سطح الک با آب مقطر استریل شستشو داده شد (۲۴). با استفاده از شرح گونه ارائه شده توسط گودی (۲۳) و کروزولی و همکاران (۱۵) نماتد *T. semipenetrans* مورد شناسایی قرار گرفت. برای جداسازی قارچ از لارو سن دوم، تخم و ماده نماتد مرکبات *T. semipenetrans* از محیط کشت آب-آگار [1] (WA) یک درصد استفاده شد. مقدار ۲-۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم استخراج شده به روش مخلوط کن و سانتریفوژ (۲۴) به تشتک پتری محتوی محیط کشت WA یک درصد حاوی استرپتومایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای ۷-

1- water agar

۳ روز نگهداری شد. سوسپانسیون لارو (تهیه شده به روش الک و سانتریفوژ و سینی Tray) نیز به محیط کشت WA انتقال داده شد. پس از گذشت این زمان، پتری‌ها در زیر بینوکولر به منظور رشد پرگنه قارچ مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل مختلف نماتد که قارچ از درون آنها رشد کرده بود، به محیط کشت PDA [1] انتقال یافتند. به منظور خالص سازی قارچ‌های رشد یافته روی PDA از روش تک اسپور کردن استفاده شد. پس از خالص‌سازی و تهیه اسلاید، شناسایی قارچ‌های آنتاگونیست با استفاده از منابع معتبر علمی، از جمله کلیدهای شناسایی، نلسون و همکاران (۳۶)، بوس (۱۰)، سامسون (۴۲) و دامش و همکاران (۱۷) صورت گرفت.

نهال‌های لیموی شش ماهه (*Mexican lime*) رشد یافته در شرایط استریل گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات مرکبات رامسر، پس ازشستشوی ریشه‌ها با دقت در گلدان‌های پلی‌اتیلن (با وزن ۱/۵ کیلوگرم خاک) کشت شدند. برای کاشت نهال‌ها از خاک استریل استفاده شد. برای این منظور، ابتدا خاک که مخلوطی از ماسه، کود دامی و خاک به نسبت ۱:۱:۱ بود در اتوکلاو با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد استریل شد و سپس به گلدان‌ها منتقل گردید. نهال‌ها در گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات رامسر با دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. مراقبت‌های معمولی گلخانه‌ای از قبیل آبیاری و وجین علف‌های هرز انجام شد. جهت تکثیر نماتد، نهال‌های لیموی شش ماهه با ۳۰۰۰ لارو سن دوم نماتد مرکبات تلقیح شد. هر نهال با ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون محتوی ۳۰۰۰ لارو سن دوم مرکبات تلقیح شد. این سوسپانسیون به مقدار مساوی در شش سوراخ به عمق پنج سانتی‌متر اطراف ریشه هر نهال تزریق و سوراخ‌ها با خاک پوشیده شدند. نهال‌های تلقیح شده در گلخانه با دمای ۲۷-۲۰ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند.

به‌منظور تهیه مایه تلقیح، قارچ‌ها روی بستر آلی مناسب کشت گردیدند. جهت تکثیر قارچ‌ها از بستر کاه گندم غنی شده با PDاستفاده گردید. بدین منظور، ابتدا با دستگاه خردکن قطعاتی از کاه گندم به اندازه ۳-۲ سانتی‌متر تهیه گردید. پس از ۲۴ ساعت خیساندن کاه در آب و فشردن آن، کاه مرطوب دو مرتبه به‌فاصله یک روز اتوکلاو شد. برای تهیه کاه غنی شده مقداری کاه مرطوب سترون به مدت ۱۵ دقیقه در PD (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی و ۲۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب) خیسانده و پس از فشردن با دست، اتوکلاو شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین اتوکلاو، کاه در زیر هود به پتری منتقل گردید. هر پتری با چند بلوک پنج میلی‌متری از قارچ مورد نظر که قبلاً روی PDA کشت داده شده بود، آلوده و پس از مخلوط کردن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز نگهداری شد. هر گلدان (با وزن ۱/۵کیلوگرم خاک) در شرایط گلخانه با ۱۰ گرم قارچ رشد یافته روی قطعات کاه گندم (10^7 اسپور در هر گرم خاک) تلقیح شد. جامعه آماری طرح آزمایشی، شامل ۳۶ گلدان بود. یک هفته پس از نشاءکاری نهال‌ها، قارچ‌های رشد یافته روی بسترهای کاه گندم غنی شده با PD به ۳۰ گلدان (هر گلدان با ۱۰ گرم قارچ) تلقیح شد و نهال‌ها به مدت دو روز آبیاری نشدند.

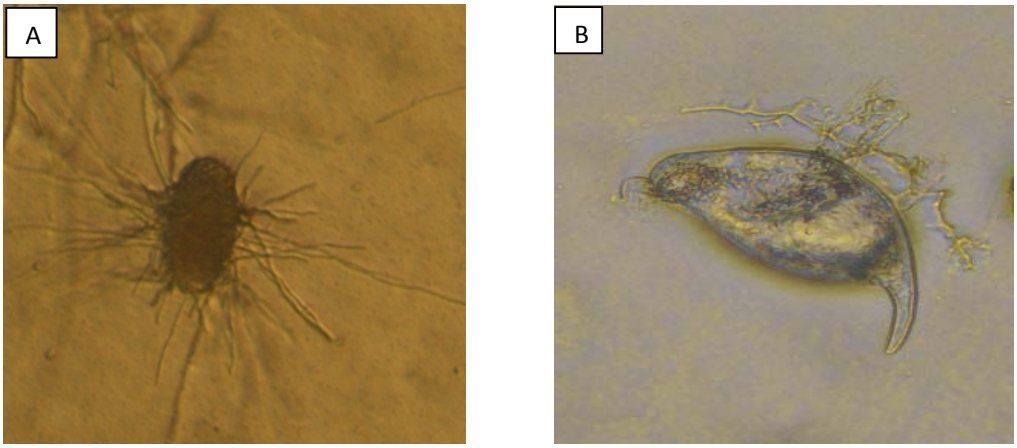
چون زمان تلقیح نماتد عامل مهمی در این تحقیق محسوب می‌شد و نیاز به دو زمان تلقیح بود، ابتدا ۱۵ گلدان (سه تکرار برای هر تیمار قارچی) از مجموع ۳۶ گلدان پس از گذشت ۱۰ روز از تلقیح قارچ‌ها با ۴۰۰۰ لارو سن دوم این نماتد تلقیح شدند. ۱۵ گلدان باقیمانده از تیمارهای قارچی پس از ۲۰ روز از تلقیح قارچ با این تعداد نماتد تلقیح شدند. جمعیت مورد نظر برای مایه‌زنی از جمعیت خالص تکثیر شده روی نهال‌های لیمو به دست آمد. پس از استخراج نماتدها با روش سینی، با استفاده از پتری شمارش تخمین نسبتاً دقیقی از جمعیت (با حداقل ۳ بار شمارش) انجام و سپس مایه‌زنی انجام شد. در تیمار نماتدکش از سم فنامیفوس (نماکور،گرانول ده درصد) به میزان ۲ گرم در هر گلدان استفاده شد. تیمار شاهد شامل گلدان‌های تلقیح یافته با ۴۰۰۰ لارو سن دوم نماتد مرکبات بود. قالب آماری طرح آزمایشی، فاکتوریل با هفت تیمار و سه تکرار بود. تیمارها شامل: قارچ *P.lilacinus*، قارچ *A. strictum*، قارچ *F.oxysporum*، قارچ *F.solani*، قارچ *C.cladosporioides*، سم فنامیفوس (نماکور،گرانول ده درصد) به میزان دو گرم در هر گلدان و شاهد (آلوده به نماتد مرکبات) بودند. پیاده نمودن طرح آزمایشی در دو نوبت و در گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات رامسر صورت پذیرفت.

پس از گذشت دو ماه از تلقیح نماتد، نهال‌ها از گلدان خارج و ریشه‌ها از بخش هوایی جدا شده و به همراه خاک گلدان به آزمایشگاه منتقل گردیدند. ریشه‌ها با استفاده از روش ساتی (۴۴) رنگ‌آمیزی شدند و تعداد ماده‌ها در یک گرم ریشه شمارش گردید. به منظور تعیین جمعیت لارو سن دوم، خاک ها سانتریفوژ شده و تعداد لاروها در ۱۰۰ گرم خاک شمارش گردید. در نهایت داده های ثبت شده با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

پس از جداسازی نماتد از خاک و ریشه و بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده و لارو سن دوم نماتد و با استفاده از شرح گونه ارائه شده توسط گودی (۲۳) و کروزولی و همکاران (۱۵) جمعیت مورد مطالعه با گونه *Tylenchulus semipenetrans* مطابقت کامل نشان داد.

1- potato dextrose agar



شکل ۱-نماتدهای پارازیت شده توسط قارچ ها: A: تخم آلوده به *Cladosporium cladosporioides* (۵۰ برابر) B: نماتد ماده آلوده به *Fusarium solani* (۵۰ برابر)

پس از جمع‌آوری تمام اطلاعات لازم در مورد قارچ‌های آنتاگونیست و با استفاده از منابع معتبر علمی، از جمله کلیدهای شناسایی فوزاریوم نلسون و همکاران (۳۶)، بوس (۱۰)، سامسون (۴۲) و دامش و همکاران (۱۷) شناسایی گردیدند. در نهایت گونه‌های *F. oxysporum, F. solani, P. lilacinus, C. cladosporioides,* و *A. strictum* از لارو، تخم و نماتد ماده *T. semipenetrans* جداسازی شدند.

نتایج به دست آمده از ارزیابی آنتاگونیستی در شرایط گلخانه در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. این نتایج در دو نوبت آزمون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و بدلیل معنی دار نشدن اختلاف اثر تکرار، داده ها با هم تلفیق شده‌اند. با استناد به جدول ۱ تیمارهای آزمایشی مستقل در مورد شاخص تعداد نماتد ماده در یک گرم ریشه، کلیه‌ی تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹٪ (α=۰/۰۱) داشتند. یعنی به کار بردن تمامی تیمارها باعث کاهش جمعیت نماتد ماده در یک گرم ریشه شد. موثرترین تیمار در کاهش جمعیت نماتد ماده در یک گرم ریشه، تیمار فنامیفوس می‌باشد که در پایین‌ترین گروه آماری نسبت به بقیه‌ی تیمارها قرار دارد. *C. cladosporioides* پس از شاهد در بالاترین گروه آماری نسبت به سایر تیمارها قرار داشت. *F. solani* در یک گروه حدواسط نسبت به بقیه‌ی تیمارها قرار گرفت. تعداد نماتد ماده در تیمارهای *A. strictum* و *P. lilacinus* با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند. با وجود این، تعداد نماتد ماده در تیمار *P. lilacinus* کمتر بود. بنابراین، با توجه به مقایسه‌ی میانگین تیمارها، در تیمارهای قارچی؛ قارچهای *P. lilacinus* و *A. strictum* بیشترین تأثیر را بر کاهش تعداد نماتد ماده دارا بودند.

جدول ۱- قارچ های آنتاگونیست جداسازی شده از مناطق نمونه برداری

محل نمونه‌برداری	مرحله زیستی نماتد	قارچ‌های آنتاگونیست
چابکسر	لارو، ماده و تخم	*F.solani, F. oxysporum, A. strictum, C. cladosporioides*
کلاچای	لارو	*F. solani, F. oxysporum, A. strictum*
رودسر	لارو، ماده	*P. lilacinus, F. oxysporum, C. cladosporioides*
لنگرود	لارو، ماده وتخم	*F. solani, F. oxysporum, A. strictum*
رامسر- سادات شهر	تخم	*C. cladosporioides, F.solani, F. oxysporum*
رامسر	لارو، ماده و تخم	*P. lilacinus, F. solani, F. oxysporum, A. strictum, C. cladosporioides*
تنکابن	لارو و تخم	*C. cladosporioides, F. solani, F.oxysporum*
سلمان‌شهر	ماده و تخم	*F. solani, F. oxysporum, C. cladosporioides*
عباس‌آباد	لارو، ماده، تخم	*P. lilacinus, A. strictum*
چالوس	لارو، ماده، تخم	*F. oxysporum, F. solani, A. strictum, P. lilacinus,C. cladosporioides*
نوشهر	لارو، ماده، تخم	*P. lilacinus, F. solani, F. oxysporum*

در شاخص تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک نیز کلیه‌ی تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و در این بین نماتدکش فنامیفوس در پایین‌ترین گروه آماری نسبت به بقیه قرار می‌گیرد. در مجموع، می‌توان گفت که بهترین تیمار آزمایشی در بین قارچ‌های جدا شده در شاخص تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک، قارچ‌های *P. lilacinus* و *A. strictum* بودند و ضعیف‌ترین تیمار *C. cladosporioides* و بعد از آن قارچ *F. oxysporum* بود. به نظر می‌رسد در این شاخص نیز تیمارهای *P. lilacinus* و *A. strictum* به یک میزان روی کاهش جمعیت لارو موثر بوده‌اند و در یک گروه آماری قرار گرفتند.

به منظور بررسی تاثیر زمان بر عملکرد تیمارهای قارچی، دو زمان تلقیح نماتد *T. semipenetrans* به کار برده شد. یک زمان ۱۰ روز و دیگری ۲۰ روز پس از تلقیح قارچ. نتایج نشان داد که ارتباط مثبتی بین مرگ و میر نماتد و زمان تلقیح قارچ وجود دارد. میانگین تعداد نماتد ماده در یک گرم ریشه در زمان ۱۰ روز (تلقیح نماتد ۱۰ روز پس از تلقیح قارچ) بیشتر از زمان ۲۰ روز بود و در مورد میانگین تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک نیز اینگونه بود (جدول ۳). بنابراین زمانی که تلقیح نماتد ۲۰ روز پس از تلقیح قارچ صورت گیرد تیمارهای قارچی تاثیر بیشتری دارند و قادر به کاهش بیشتر جمعیت نماتد خواهند بود.

بحث

لوکاس و همکاران (۴۶) قارچ‌های *P. lilacinus, Fusarium solani, F. oxysporum, Verticillium fungicola, Talaromyces cyanescens, Cylindrocarpon cylindroids, Caetomium robustum, Arthrobotrys oligospora, Acremonium strictum, Engyodontium album, Myrothecium verrucaria, Emericella rugulosa* و *Tarracomyces gigaspora* را روی تخم، ماده و لارو سن دوم نماتد مرکبات شناسایی کردند. این قارچ‌ها تقریبا مشابه قارچ‌های جداسازی شده در این تحقیق بود. از جمله مهم‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست نماتد مرکبات *P. lilacinus* می‌باشد که از شایع‌ترین گونه‌هایی است که از تخم‌ها، ماده‌ها و لاروهای سن دوم نماتد مرکبات در اسپانیا جدا شده است (۲۱). *P. lilacinus* اولین بار همراه با تخم نماتد در سال ۱۹۷۶ مشاهده شده (۳۱) و سپس این قارچ به عنوان پارازیت تخم‌های *Meloidogyne incognita* در پرو یافت شد. مواد آلی کلونیزه شده توسط قارچ *Paecilomyces lilacinus* جمعیت نماتد مرکبات *T. semipenetrans* را در باغات مرکبات کاهش داده است (۲۵). قارچ‌های *F. oxysporum*, *F. solani* و *Stagonospora heteroderae* از ۴۰ درصد سیست‌های نماتد H. glycines جداسازی گردید (۳۵). همچنین بیش از ۳۰ جنس و۸۰ گونه قارچ به عنوان پارازیت کننده نماتد *Meloidogyne* spp. در جهان شناسایی شده که *Monacrosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *P. lilacinus*, و *Pochonia chlamydosporia* (*Verticillium chlamydosporium*) از جمله این قارچ‌ها محسوب می‌شوند (۱۲، ۲۲، ۳۰، ۴۱ و ۵۰). قارچ *Acremonium strictum* جداسازی شده از *Heterodera glycines* اثر ممانعت کننده‌ای روی تفریخ تخم نماتد H. *glycines* و *M. incognita* داشته است (۳۴).

جدول ۲- تاثیر تیمارهای مختلف روی جمعیت لارو و نماتد ماده *Tylenchulus semipenetrans* در شرایط گلخانه

تیمارهای آزمایشی	تعداد نماتد ماده در یک گرم ریشه	تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک
Acremonium strictum	۶۹/۵۰d	۲۰۹d
Cladosporium cladosporioides	۷۷/۳۳b	۲۶۰/۸b
Fusarium oxysporum	۸۷/۵۰c	۲۳۳/۷c
Fusarium solani	۸۲/۱۷bc	۲۴۲/۷bc
Paecilomyces lilacinus	۶۶d	۱۹۵/۲d
Fenamiphos	۳۱e	۸۶/۳۳e
Control	۱۴۳/۷a	۴۳۰/۳a

در هر ستون اعدادی با حروف مشابه، در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند

جدول ۳- مقایسه تاثیر زمان تلقیح بر جمعیت نماتد

تیمار	تعداد ماده در یک گرم ریشه	تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک
۱۰ روز	۸۲/۱۹a	۲۴۳/۷۶a
۲۰ روز	۷۷b	۲۲۹/۹۵b

در هر ستون اعدادی با حروف مشابه، در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند

جنس‌های *Paecilomyces*, *Fusarium* و *Acremonium* از جمله قارچ‌هایی هستند که از سایر نماتدها نیز گزارش شده‌اند مثلا حجت جلالی و کاسمن (۴) از سیست‌های جمع‌آوری شده از مزارع چغندر استان‌های آذربایجان غربی، فارس، کرمانشاه، کرمان و خراسان گونه‌های *P. lilacinus*, *Fusarium* spp., *Verticillium lecani*, *V. chlamydosporium*, *Acremonium* spp., *Embellisia chlamydospora* و *Scophulariopsis brevicaulis* را جدا نموده که تعدادی از آنها پارازیت تخم نماتد چغندرقند می‌باشند. کاهش آلودگی نماتد *M. javanica* در گوجه-فرنگی به وسیله‌ی *P.lilacinus* توسط صدیقی و همکاران (۴۳) نیز گزارش گردید.

در این تحقیق نیز به منظور کشت انبوه قارچها از بستر کاه خرد غنی شده با PD استفاده گردید. پاک‌نیت و همکاران (۳) گزارش کردند از میان بیش از ده بستر رشد قارچ مورد آزمون، کاه گندم خرد شده و غنی شده با عصاره سیب‌زمینی و دکستروز[1] مناسب تشخیص داده شد. مانی و همکارانش (۳۲) رشد قارچ *P. lilacinus* را روی سوبستراهای مختلف گندم، ارزن، سورگوم و برنج مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تعداد *T. semipenetrans* با افزایش سطوح اینوکلوم قارچ *P. lilacinus* به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. جاتالا (۲۵) دانه‌های غلات را و زکی و هاتی (۴۷) استفاده از دانه‌های نخود و برگ‌های گیاه چریش را برای کشت انبوه قارچ *P.lilacinus* پیشنهاد کردند.

در تحقیق حاضر مقدار ۱۰ گرم قارچ (10^7 اسپور در هر گرم خاک) در هر گلدان به کار برده شد. قارچ *P. lilacinus* روی نماتد مرکبات *T. semipenetrans* مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده گردید بیشترین کاهش در جمعیت نماتد زمانی حاصل می‌شود که هشت گرم قارچ در هر کیلوگرم خاک استفاده شود (۳۳). کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica* به وسیله جدایه BI *Trichoderma harzianum* در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر قارچ درمقایسه با غلظت های کمتر به طور معنی داری موجب کاهش قطر گال، تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم گردید، در حالی که در مقایسه با غلظت های بیشتر اختلاف معنی دار نداشت (۶). زکی و مقبول (۴۸) گزارش کردند که کاربرد دو گرم قارچ *P. lilacinus* در هر گلدان یک هفته قبل از تلقیح نماتد *M. javanica* بیشترین تاثیر را دارد. کابانیلاس و بارکر (۱۱) دانه گندم کلونیزه شده با قارچ *P. lilacinus* به میزان ۴-۰/۲ تن در هکتار را مصرف نمودند. نتایج به اندازه کافی رضایتبخش بود و منجر به ارائه این پیشنهاد شد که با مصرف مقدار بیشتری از سوبسترا امکان بدست آوردن اثرات مفید آن وجود خواهد داشت.

در خصوص شاخص تعداد نماتد ماده در یک گرم ریشه و تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک، تیمارهای آزمایشی برتر شامل نماتدکش فنامیفوس، *A. strictum* و *P. lilacinus* بودند. نتایج نشان داد که نماتدکش کارایی بهتری در کاهش جمعیت نماتد و افزایش عملکرد داشته است. از طرف دیگر، در بین گونه‌های قارچی با خاصیت کنترل کنندگی تیمارهای قارچی *P. lilacinus* و *A. strictum* مؤثرتر از گونه‌های دیگر بوده‌اند. با این حال دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* مورد استفاده در این تحقیق نیز علیه نماتد مرکبات کارایی خوبی داشتند. با وجود اینکه نماتدکش فنامیفوس در مقایسه با گونه‌های قارچی با خاصیت ضدنماتدی کارایی بهتری در کاهش جمعیت و خسارت نماتد مرکبات داشته است، ولی به دلیل مقرون به صرفه نبودن آن، خطرات بالای زیست محیطی و پایداری در محیط، می‌تواند جایگزین مناسبی در بین عوامل آنتاگونیستی قارچی داشته باشد.

همچنین مقایسه زمان تلقیح نماتد نشان داد در تیمارهایی که تلقیح نماتد ۲۰ روز پس از تلقیح قارچ صورت گرفت، جمعیت نماتد ماده و جمعیت لارو سن دوم به میزان پایین‌تری مشاهده شد. این نکته بیانگر ایجاد فرصت مناسب برای استقرار عامل کنترل زیستی و اثر بخش بودن مطلوبتر آن پس از سازگاری با محیط است. از آنجایی که تخم‌های نماتد مرکبات محصور در یک ماده ژلاتینی بوده و فاقد پوشش حفاظتی هستند، انتظار بر این است که نسبت به تخم‌های نماتد سیستی بیشتر در معرض عوامل زیستی نظیر قارچها قرار داشته باشند. بخشی از بدن ماده‌های *T. semipenetrans* و تخم‌ها همیشه در تماس با خاک بوده و امکان مناسبی جهت انگلی شدن فراهم می‌آورد. نتایج نشان داد ارتباط مثبتی بین مرگ و میر و زمان تلقیح نماتد وجود دارد.

ازهراقبال (۹) اثر قارچ *P. lilacinus* و زمان تلقیح آن را روی نماتد *T. semipenetrans* مورد بررسی قرار داد و مشخص شد زمانی که قارچ ۲۰ روز قبل از تلقیح نماتد به تیمار اضافه شود، تعداد نماتد ماده در یک سانتی‌متر ریشه به میزان ۲۶/۶۹ درصد کاهش نشان می‌دهد. در این تحقیق نیز تلقیح نماتد در ۲ زمان (۱۰ و ۲۰ روز بعد از تلقیح قارچ) از نظر جمعیت نماتد ماده در یک گرم ریشه و جمعیت لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک باهم مورد مقایسه قرار گرفتند و زمان ۲۰ روز نتایج بهتری را به دنبال داشت. چنانچه قارچهای آنتاگونیست فرصت کافی برای اشغال کردن ناحیه‌ی فراریشه را داشته باشند، می‌توانند در ارتباط نزدیک با نماتد قرار گرفته و درصد بیشتری از آنها را پارازیت کنند. تیمارهای قارچی که پس از ۲۰ روز با نماتد تلقیح شدند، فرصت کافی برای تکثیر و استقرار در

1- PD

فراریشه را داشتند. بررسی اثرات *P. lilacinus* روی نماتد مولد غده *M. incognita* نشان داد این قارچ گال‌های ایجاد شده توسط نماتد در ریشه گوجه فرنگی را ۶۶ درصد، تعداد توده تخم را ۷۴ درصد و جمعیت نهایی نماتد را ۷۱ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کنترل کرده است (۲۸). لارا و همکاران (۲۹) بیان کردند که *P. lilacinus* جمعیت نماتد *M. incognita* موجود در خاک و ریشه را کاهش داده و باعث افزایش محصول گوجه‌فرنگی می‌شود. کاهش در تعداد گال‌ها، تعداد تخم در هر توده و جمعیت نهایی نماتد *M.incognita* در خاک، در گیاهان تیمار شده با قارچ *P. lilacinus* مشاهده گردید (۳۸).

fenamiphos و oxamyl به طور قابل توجهی جمعیت لارو سن دوم نماتد مرکبات و نماتدهای ماده بالغ تغذیه کننده روی ریشه را کاهش دادند ولی بر عملکرد محصول و سایز میوه تاثیری نداشتند (۱۶). تاثیر سه نماتدکش cadusafos, fenamiphos و vydate بر نماتد مرکبات توسط تنها معافی و دامادزاده (۴۵) مورد بررسی قرار گرفت. تاثیر این نماتدکش‌ها بر نماتد مرکبات در شرایط گلخانه‌ای نشان داد که ترکیب گرانوله نماتد کش‌های fenamiphos و cadusafos با غلظت‌های ۴ و ۸ ppm وقتی همزمان با تلقیح نهال‌ها با نماتد، به کار گرفته شد، در کنترل لاروهای سن دوم نماتد مرکبات و جلوگیری از نفوذ آن‌ها به ریشه‌ها بیشترین تاثیر را داشتند. همچنین نماتدکش‌های fenamiphos و vydate با غلظت ۸ ppm زمانی که ۶ هفته بعد از تلقیح نهال‌ها با نماتد مرکبات به گلدان‌ها اضافه شدند، بیشترین تاثیر را بر نماتد در ریشه داشتند. اگرچه تیمار با نماتدکش جمعیت نماتد در خاک و ریشه را کاهش داد، اما تأثیری روی وزن میوه و اندازه آن را بهبود نمی‌بخشد. در این تحقیق به میزان ۲ گرم فنامیفوس در هر گلدان استفاده شد، که این مقدار باعث کنترل ۷۹ درصدی جمعیت لارو سن دوم و ۷۸ درصدی جمعیت نماتد ماده نسبت به تیمار شاهد شد.

منابع

۱-احمدی ع.، شریفی تهرانی ع.، خیری ا. و حجارود ق .۱۳۷۷ . جداسازی قارچ ها ی *Fusarium solani* و.spp *Paecilomyces* از *Heterodera schachtii* و کارآیی آنها در کنترل بیولوژیکی تخم های نماتود در شرایط آزمایشگاه .بیماری‌های گیاهی. ۳۴(۳و۴): ۱۸۶-۱۹۷

۲- باروتی ش. و علوی ا. ۱۳۷۴. اصول نماتد شناسی گیاهی. انتشارات رشد مؤلفین.

۳- پاک نیت م.، بنی‌هاشمی ض. و ذاکری ع. ۱۳۸۰. استفاده از بستره کاه گندم بمنظور استقرار *Paecilomyces lilacinus* در فرایشه (ریزوسفر) لیموترش. بیماریهای گیاهی. جلد ۳۷. صفحه ۳۰۷-۳۱۸

۴- حجت جلالی ع. و کاسمن ژ. ۱۳۷۴ . قارچ های آنتاگونیست نماتود سیستی چغندرقند در ایران . خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج.

۵- فاطمی ص. ۱۳۷۲. جدا سازی *Paecilomyces fumosoroseus* از سیست های *Heterodera schachtii* خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه گیلان، رشت.

۶- ملکی زیارتی ح.، روستایی ع.، صاحبانی ن.، اعتباریان ح.ر. و امینیان ح. ۱۳۸۸. بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood به وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه .مجله به زراعی نهال و بذر، ۲-۲۵(۳) :۲۷۲-۲۵۹.

۷- مهدی خانی مقدم ع.، روحانی ح. و فلاحی رستگار م. ۱۳۸۸. کنترل بیولوژیکی نماتود سیستی چغندر قند *Heterodera schachtii* به وسیله قارچ تریکودرما در آزمایشگاه و گلخانه. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال سیزدهم، شماره ۴۸، صفحات ۳۰۱ تا ۳۱۴.

8- Ayazpour K., and Ghanaatian A. 2004. Determination of root parasite nematodes of citrus in Jahrom (Fars province, Iran). Final Research Project, p. 28.

9- Azhar Iqbal M. 2003. Ecology, biology and integrated control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb) the cause of slow decline in the Punjab, Pakistan. MSc. Thesis, submitted to University of Agriculture Faisalabad, Pakestan, 201 pp.

10- Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*.Commonwelth Mycological Institute Kew, Surrey, England, CAB international, 237pp.

11- Cabanillas E., Barker K.R., and Nelson L.A. 1989. Survival of *Paecilomyces lilacinus* in selected carriers and related effects on *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Nematology, 21:30-121.

12- Chen S.Y., Dickson D.W., and Whitty E.B. 1996. Fungi associated with egg masses of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in a Florida tobacco. Nematropica, 26:153–157.

13- Cobb N.A. 1920. Transference of nematodes (*Mononchus*) from place to place for economic purposes. Science, 51:1- 640

14- Croshier R., Montecinos G., Jimenez M., and Gallo P. 1985. Effectiveness of *Paecilomyces lilacinus* Thom Samson in the control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematology Network Newsletter, 2(3): 3.

15- Crozzoli R., Lamberti F., Greco N., and Rivas D. 1998. Nematodes fitoparasiticos associados con los citricos en Venezuela. Nematologica Mediterranea, 26:31-58

16- Daivs R.M., and Wilhite H.S. 1985. Control of *Tylenchulus semipenertans* on citrus with fenamiphos and oxamyl. Plant Disease, 69(11): 974-976.

17- Domsch K.H., Gams W., and Anderson T.H. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd ed. IHW-Verlag. Eching. Germany. 672p.

18- Duncan L.W., and Cohn E. 1990. In: Nematode Diseases of Citrus. Plant Parasitic Nematodes In Subtropical and Tropical agriculture. CAB international. Wallingford. UK. p. 321-346**.**

19- Duncan W.L. 2005. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.2nd ed. P. 437-465.

20- Gaspard J.T., and Mankau R. 1986. Nematophagous fungi associated with *Tylenchulus semipenetrans* and citrus rhizosphere. Nematologica, 32(3): 359-363.

21- Gene J., Verdejo-Lucas S., Stchigel A.S., Sorribas F.J., and Guarro J. 2005. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. Biocontrol Science and Technology, 15(7):721-731.

22- Godoy G., Rodriguez-Kabana R., and Morgan-Jones G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and green house studies. Nematropica, 13:201–213.

23- Goodey J.B. 1963. Soil and freshwater nematodes. John Wiley & Sons inc, 389 pp.

24- Hussey R.S., and Baker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inoculum of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Disease Reporter, 57:1025-1028.

25- Jatala P. 1981. Biological control of *Meloidogyne* spp. Methodology for preparation and establishment of *Paecilomyces lilacinus* for field inoculations. Proc. Third res. Plan. Conf. *Meloidogyne* spp. Jakart, Indonesia. P. 228-231.

26- Jatala P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 24:89-453.

27- Jenkins W.R. 1964. A rapid centrifugal- flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48, 692.

28- Kiewnick S., and Sikora R.A. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Biological Control, 38:179–187.

29- Lara J., Acosta N., Betancourt C., Vincente N., and Rodrı´guez R. 1996. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. Nematropica, 26:143–152.

30- Li T.F., Lel L.P., and Yang M. 1994. Isolation and identification of natural enemies' fungi of tobacco root-knot nematodes. Chinese Tobacco, 1:22–24.

31- Lysek H. 1976. Autodehelminthization of soil in lowland deciduous forests. Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae**,** 41:73-106.

32- Mani A., Murthy I.R., and Prasad P.K. 1989. Growth of *Paecilomyces lilacinus* on natural substrates and its efficacy against citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Journal of Biological Control, 3:59-61.

33- Maznoor S., Sinha A.K., and Bora B.C. 2002. Management of citrus nematod, *Tylenchulus semipenetrans,* on khasi mandarin, by *Paecilomyces lilacinus.* Indian Journal of Nematology, 32(2):153-155.

34- Meyer S.L.F., Huettel R.N., Liu X.Z., Humber R.A., Juba J., and Nito J.K. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root knot nematode egg hatch and juvenile mortility. Nematology, 6:23-32.

35- Morgan-Jones G., Rodriguez-Kabana R., and Tovar J.G. 1984. Fungi associated with cysts of *Heterodera glycines* in the Cauca Valley, Colombia. Nematropica, 14:7-137.

36- Nelson E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* Species an illustrated manual for identification. The Pennsylv Ania State University Press University Park and London. P. 250.
37- Nigh E.A., Thomason I.J., and Van Gundy S.D. 1980. Identification and distribution of fungal parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California. Phytopathology, 70:884-889.
38- Pandey R., and Trivedi P.C. 1992. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* in *Capsicum annuum*. India Phytopathology, 45:134-135.
39- Pasha M.J., Zaidi S.B.I., Khan M.W., and Siddiqui Z.A. 1988. An observation on slow decline of lemon trees (Citrus Limon) and associated fungi in Aligarh area. Indian Journal of Plant Pathology, 6 (1):28-30.
40- Reddey P.P., Rao M.S., and Nagesh M. 1996. Management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. Nematologica Mediterranea, 24:265-267.
41- Roccuzzo G., Ciancio A., and Bonsignora R. 1993. Population density and soil antagonists of *Meloidogyne hapla* infecting kiwi in southern Italy. Fundamental and Applied Nematology, 16:151–154.
42- Siddiqui I.A., Qureshi S.A., Sultana V., Ehteshamul-Haque S., and Ghaffar A. 2000. Biological control of rot-root knot disease complex of tomato. Plant Soil, 227: 163-169.
43- Samson R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes.* Studies in Mycology, 6:119.
44- Southey J.F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London. 72pp.
45- Tanha Maafi Z., and Damadzadeh M. 2007. Incidence and control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetran*s Cobb, in north of Iran. Nematology, 10 (1):113-122.
46- Verdejo-Lucas S., Viera A., Stchigel A.M., and Sorriba F.J. 2009. Screening culture filtrates of fungi for activity against *Tylenchulus semipenetrans*. Spanish Journal of Agricultural Research, 7(4):896-904.
47- Zaki F.A., and Bhatti D.S. 1988. Economic method of mass culturing of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Curt. Sci*, 57, 153.
48- Zaki M.J., and Maqbool M.A. 1991. *Paecilomyces lilacinus* controls *Meloidogyne javanica* on chickpea. Int. Chickpea Newsletter, 25:22-23.
49- Walter D.E., and Kaplan D.T. 1990. Antagonists of plant parasitic nematode in Florida citrus**.** Journal of Nematology, 22: 567-573.
50- Wang L.F., Yang B.J., and Li C.D. 2001. Investigation of parasitic fungi on root knot nematodes in East China. Mycosystema, 20:264–267.